高解像度質量顕微鏡を用いた薬物動態の解析

Pharmacokinetic Analysis Using a High Spatial-Resolution Mass Microscope

齋藤祐介^{1*}・早坂孝宏¹・尾上健児¹・瀧澤義徳²

梶原茂樹³・小河 潔³・瀬藤光利¹

Yusuke SAITO,¹ Takahiro HAYASAKA,¹ Kenji ONOUE,¹
Yoshinori TAKIZAWA,² Shigeki KAJIHARA,³ Kiyoshi OGAWA,³
and Mitsutoshi SETOU¹

¹ 浜松医科大学医学部医学科解剖学講座細胞生物学分野 *Department of Cell Biology and Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, JAPAN*

² 浜松医科大学耳鼻咽喉科 *Department of Otolaryngology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, JAPAN*

³ 株式会社島津製作所基盤技術研究所 *Technology Research Laboratory, Shimadzu Corporation, Seika-cho, Soraku-gun, KYOTO, JAPAN*

Imaging mass spectrometry (IMS) has recently been applied to the analysis of drug kinetics using an animal model. Previous reports revealed that IMS could be used to identify the organ where an administered drug was distributed to. In this study, we attempted to visualize the distribution of Famotidine with a higher spatial-resolution in mouse sections using a Mass Microscope that we developed in collaboration with the Shimadzu Corp. In IMS analyses of whole-body sections, Famotidine was found to be distributed largely in the kidney. Moreover, a higher spatial-resolution analysis of the kidney revealed indicated that Famotidine was distributed in the renal pelvis of the kidney. The results suggest that the Famotidine is concentrated in the renal pelvis through the cortex and marrow in the kidney during the excretion process. It can therefore be concluded that a Mass Microscope permits deeper insight into therapeutic and toxicological processes associated with drug administration to be enabled, with a high spatial-resolution.

DOI: 10.5702/massspec.11-22

(Received April 5, 2011; Accepted May 9, 2011)

1. 序 論

質量顕微鏡法 (imaging mass spectrometry: IMS) は質量分析法 (mass spectrometry: MS) と顕微鏡法を組み合わせた手法である¹⁾。一般的な質量分析法は解析する試料を均質化した後、分離、精製して測定することで、試料中の分子を同定することが可能になるが、分子の分布情報を得ることはできない。一方で、顕微鏡法は観察対象の組織構造もしくは精製タンパク質の立体構造を明らかにすることができる²⁾が未知分子の同定はできない。すなわち抗体を用いた免疫染色法や GFP に代表される蛍光タンパク質

を用いた手法では、解析対象とする分子の構造情報が事前に判明される必要があり、特に免疫染色では抗体の非特異的結合によって目的物質以外の物質を検出してしまいう可能性がある。これらの両手法の長所を活かし、短所を補うべく開発されたのが IMS である。この IMS では MS によって組織切片上をレーザー走査することにより、各測定点からさまざまな分子に対応する質量情報を取得することが可能である。本手法では観察対象となる物質をラベリングする必要がなく、一度の測定で多くの分子を検出できる。これらの情報は専用のソフトウェアを用いて処理でき、観察対象分子の分布情報は全測定点におけるシグナル強度をもとにして二次元画像として構築される。

古くから、半導体産業や鉄鋼産業における分析手法として secondary ion mass spectrometry (SIMS) によるイオン化でマッピングする技術が用いられていた。この手法は 1 次イオンビームを高真空中で試料に照射し、試料表面から物質が放出される際に生じる 2 次イオンを利用してお

* Correspondence to: Yusuke SAITO, *Department of Cell Biology and Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, JAPAN*, e-mail: saito-yusuke0527@gmail.com
齋藤祐介, 浜松医科大学医学部医学科解剖学講座細胞生物学分野, 〒431-3192 静岡県浜松市東区半田山 1-20-1

り、試料表面深さ方向の高度な元素組成分析が行える^{3), 4)}。この手法は1次イオンビームのエネルギーが強すぎるために対象物質の断片化を引き起こしやすいことから、低分子解析への適用が積極的に進められてきた。一方、クラスターイオンビームの技術⁵⁾によって1次イオンのダメージの低減が可能になり、有機分子もフラグメント化されずにイオン化することが可能になってきており⁶⁾、生体試料を含めた有機化合物のSIMSが本格的に行われるようになったが⁷⁾、SIMSでは大きな質量(>1,000 Da)をもった分子はイオン化されず、観察対象が制限されてしまう。これに対してマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption ionization: MALDI)の技術革新によってタンパク質や脂質などの生体分子のイオン化が可能になった。MALDIにおける試料は多量のマトリックス中に置かれ、マトリックスとの混晶状態になっていると考えられる。マトリックスは照射された紫外線レーザーを吸収し、これを熱エネルギーに変換する。その結果、マトリックスの一部が急速に加熱され、試料とともに気化(昇華)する。MALDIの場合、マトリックスを介して試料をイオン化するため、熱に不安定で分解しやすい試料についてもフラグメンテーションを起こさずに測定が可能となる。近年のイオントラップ(ion trap: IT)や飛行時間型(time-of-flight: TOF)質量分析装置等の技術革新によって、高い質量分解能で高い質量精度をもつMS分析や、高精度のタンデム質量分析(MS/MS)が可能になってきたため、MALDIによる解析も大きく進歩してきた。

こうした背景から最近ではMALDIを用いたIMSはわれわれのグループを含め世界中の研究者が取り組んでいる。病態の解明に用いた例では、アルツハイマー病モデル動物の脳切片におけるアミロイド β ペプチド分布をイメージングし評価した報告⁸⁾やヒトの癌転移組織に特異的に存在するバイオマーカーの同定を行った報告^{9)~11)}など、さまざまな分野で解析が行われており、特に近年では医薬品開発への応用を目的とした薬物動態の解析にも用いられてきている^{12), 13)}。

医薬品開発では、基礎研究で得られた候補薬物が承認に至るまでにおよそ10年かかり、最終的に市場で販売される確率は1%にも満たない。近年の調査によると、1990年代と比較して2000年代では治験コーディネータや治験支援施設機関の積極的な利用により、臨床試験に要する期間は約2年短縮されている。一方で前臨床試験では候補薬物が臨床試験に至るまでの確率は増加したものの、前臨床試験に要する期間は以前と変わっていない¹⁴⁾。これは膨大な候補薬物をスクリーニングする際の方法論に技術的な革新が起こっていないことが一因であると考えられる。一般的に前臨床試験では、放射性化合物を用いて標識化した候補薬物をモデル動物に投与し、その体内分布、蓄積性、毒性などを全身オートラジオグラフィーによって評価する。しかしながら、放射性化合物を用いた実験は標識化にコストや時間を必要とし、さらに実験者の被爆の危険性や放射性廃棄物の問題は避けては通れない。そこで、これに替わ

る手法としてIMSが注目を集めている。例えば、SchwartzやCaprioliらはオランザピンの薬物動態をIMSで解析した結果、全身オートラジオグラフィーと同等の解像度(250 μ m)で各臓器への薬物分布を解析することに成功している¹²⁾。生体の臓器は形状や機能によって組織学的に分類され、各組織がそれぞれの役割を担っている。したがって、組織特異的な分布を期待する医薬品を評価する際、さらなる空間的分解能が必要となる。

近年、われわれは、より空間分解能の高い質量顕微鏡(Mass Microscope)を島津製作所等と共同開発し、さまざまな組織の生体成分の分布や局在を示し^{10), 15)}、また病理組織を高解像度で解析することでさまざまな病態を詳細に解析することに成功した^{4), 16)}。本研究では、Mass Microscopeを用いてマウスに投与した薬物の全身分布と、腎臓内の組織分布を高解像度で解析し、薬物の体内動態情報を迅速かつ詳細に得ることでMass Microscopeが医薬品評価法の発展に貢献できる有用なツールであることを示すために実験を行った。今回投与した薬物はヒスタミンH₂受容体拮抗剤として臨床や、市販薬としても広く用いられているファモチジンを用いた。ファモチジンは投与後の動態から代謝・排泄まで多くの情報がこれまでに報告されており^{17), 18)}、本方法論を立証し応用するうえで有用な薬物であると考え採用した。

2. 実 験

2.1 試薬

ファモチジン(Mw: 337.45)は日医工(富山、日本)より、メタノールおよび超純水はHPLC/MS用を和光純薬工業(大阪、日本)より、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)はBruker Daltonics(ライプツィヒ、ドイツ)より購入した。その他の試薬はすべて試薬特級以上を用いた。

2.2 ファモチジン標準物質の検出

ファモチジンを20 μ g/mLとなるように超純水に溶解させた。次にDHBを濃度50 mg/mLとなるように70%メタノール/0.1%トリフルオロ酢酸に溶解させマトリックス溶液とした。各溶液を1:1で混合し、Indium-tin-oxide (ITO)スライドガラス(ブルカーダルトニクス)に滴下し、乾燥後にMS測定およびMS/MS測定に用いた。

2.3 ファモチジン投与マウスサンプルの作成

実験動物としてICR系マウス(11~12週齢、雌)を用いた。ファモチジンをマウス尾静脈内へ200 mg/kg投与し、投与3分後に安楽死させた。一方、生理食塩水を同容量投与したマウスをControlとした。断頭後に皮膚を剥離除去したマウス全身サンプルを2% carboxymethyl cellulose (CMC)へ包埋後に液体窒素で凍結させ-80°Cで保存した。組織切片の作成には川本法¹⁹⁾を用いた。凍結サンプルをMass Microscopeで測定可能な大きさにあらかじめ切断した。-20°Cに設定したクライオスタット(Leica CM 1950; ライカ、ウェットラー、ドイツ)庫内に約15分間静置後切片の作成を行った。解析を目的とする断面に対して川本テープ(Cryofilm; ライカ社)を貼付し、厚さ10

μm で薄切りした。これを室温で乾燥後、ITO スライドガラス上へ導電性両面テープ (CONDUCTIVE TAPE ASSY; 島津製作所, 京都, 日本) を用いて組織面を上にして固定した。3 mL のマトリックス溶液をエアブラシ (Procon Boy FWA Platinum, 直径 0.2 mm ノズル, Mr. Hobby, 東京, 日本) で塗布した。なお, 本研究は浜松医科大学動物実験委員会の承認を受け施行した。

2.4 Mass Microscope を用いた測定

本研究におけるすべての MS 測定および MS/MS 測定には大気圧型 MALDI-QIT-TOF-MS 型の Mass Microscope²⁰⁾を用いた。イオン化部には Nd:YAG レーザー (波長 355 nm) を搭載しており, レーザー径を $10\mu\text{m}$ に設定した。イオン化はレーザーパルスエネルギー $40\mu\text{J/pulse}$ で行い, ポジティブイオンモードで測定した。測定範囲は m/z 150~500 に設定し, 各測定点へは 100 回の繰り返しレーザー照射を行った。全身切片におけるファモチジン分布解析においてレーザー照射間隔は $200\mu\text{m}$ で行い, 腎臓内の高解像度解析は $50\mu\text{m}$ で行った。この装置の現在の設定では 1 回の測定で行える最大ポイント数は縦横 250×250 ポイントであるためその範囲を超えている全身切片および腎臓切片はそれぞれ範囲を分割して測定した。MS/MS 測定におけるレーザーパルスエネルギーおよび衝突誘起解離については, 各実験において最適化した条件を採用した。ファモチジン標準物質の検出は全身切片の測定と同様の条件で行った。

2.5 イオンイメージの構築

測定によって得られた複数のデータセットを結合させるために, 専用ソフトウェア SIMtool (島津製作所) を用いた。SIMtool は, 質量顕微鏡法による測定を行ったデータを解析する目的で開発中のソフトウェアで, データのノーマライズやピークピッキングを行った後に, 主成分分析やクラスタ解析などの各種統計解析手法を用いたデータ処理を行うことができる。このソフトウェアを用いてそれぞれのデータセットを結合させた後, 各測定点におけるシグナル強度の総和 (Total ion current: TIC) が均一となるように補正した。イオンイメージの構築は BioMap (<http://www.maldd-msi.org>) を用いて行った。

3. 結果および考察

3.1 ファモチジン標準物質の検出

ファモチジンを投与する前に Mass Microscope でファモチジンの検出を確認した。MALDI を用いた MS 測定では事前に薬物の最適なイオン化条件を検討する必要がある。特に, マトリックス溶媒組成, 付加体の問題, 臓器ごとに異なるイオン化効率を克服するための標準化が重要であり, それら欠点の克服はここ 5 年来われわれのグループを含めさまざまな研究者によって取り組まれ, 条件が最適化されることで改善されてきた。今回これまでのそうした経験をもとに, 方法の部分に記載した条件に設定を行った^{9), 10), 21)~24)}。20 $\mu\text{g/mL}$ のファモチジン溶液を ITO スライドガラスへ滴下し MS 測定を行った結果を Fig. 1A に示

Fig. 1. Mass spectrum of Famotidine and an MS ion image of a whole-body section. A; Structure and mass spectrum of Famotidine. B; Mass spectrum of Famotidine detected in a tissue section. C; Mass spectrum of Famotidine detected on the kidney in a tissue section. D; Optical image of a mouse tissue section. E; MS ion image of Famotidine (m/z 338.05) on a mouse tissue section 3 min after injection. Famotidine is localized to a significant extent in the kidney. F; MS ion image at m/z 338.05 on a Control mouse tissue section.

した。測定の結果, ファモチジンにプロトンが付加されていると考えられる m/z 338.05 にピークが現れた。その他のピークはマトリックス溶液のみを測定した際に得られる MS スペクトルと同様であり, ITO スライドガラス上でファモチジンが検出できることを確認した。

生体に投与した薬物は生体内組織に存在する Na^+ や K^+ の影響を受け, MS 測定した場合には多様なイオン付加体として検出される。投与薬物が組織中から検出される生体成分と同じ m/z 値を示した場合, ピークが重複してしまう, 目的の薬物のイメージに対象外の物質のシグナルが含まれてしまう可能性がある。そこで, あらかじめ薬物を投

与していないマウスの組織切片上へファモチジンを滴下し生体成分影響下でのファモチジン標準物質のマススペクトルを Mass Microscope を用いて測定した。結果を Fig. 1B に示す。 m/z 338.05 ($[M+H]^+$), m/z 360.05 ($[M+Na]^+$), m/z 376.00 ($[M+K]^+$) にファモチジン由来と考えられるピークを確認した。また、その他のピークはファモチジンを滴下せず、マトリックス溶液のみを組織切片上に滴下して測定したスペクトルと同様であったため、これら三つのピークがファモチジン由来であり、生体由来成分やマトリックス由来のピークが重複していないことを確認した。

3.2 ファモチジンの分布

ファモチジン尾静脈内投与 3 分後のマウス断面図を Fig. 1D に示す。全身の輪郭と主要な臓器（脳、脊椎、肺、肝臓、胃、腎臓、心臓、腸）を点線で示している。体内からの薬物の排泄は、一般的に脂溶性の薬物は肝臓から胆汁中に排泄され、水溶性の薬物は腎臓から尿中に排泄される。薬物の開発段階で、投与後の代謝経路は重要な情報であり、この情報が迅速に得られれば薬物の血中濃度コントロールや副作用の軽減を目的とする改良につながる。一般的な薬物分布の評価法として、ラジオアイソトープを用いた全身オートラジオグラフィーや、薬物を投与した動物の各臓器をホモジナイズして薬物を抽出して定量する方法がある。本研究で用いた質量顕微鏡による評価では MS イメージング測定に 15 時間を要する。薬物によっては一度の測定で多くの候補薬物を解析することが可能である。各候補薬物に対してアイソトープ化と実験を必要とする全身オートラジオグラフィーを用いた評価では、候補薬物に対してアイソトープ化と実験を必要とするように、評価に至るまでの時間を短縮することができる。

本研究においてクライオスタットによる切片の作成は前述のとおり川本法を用いた。この方法は検体断面に粘性性テープを貼ることで切片作成における破損を防ぐため、今回のような骨や筋肉など硬さの異なる成分を含む大きな組織切片を作成するのに適している¹⁹⁾。全身切片は 200 μ m 間隔で測定したため 1 回の測定では Mass Microscope の測定容量を超過し測定が完了しない。そのため数回に分割して測定した。これら複数のデータセットを SIMtool によって結合させて一つのデータセットとした。MALDI ではマトリックスの分布状態がイオン化効率に影響を与えるが、スプレー法によるマトリックス塗布は手技的な問題から、その分布を均一にさせることは困難である。したがってイメージを構成しているそれぞれのスペクトルは相対的な強度を単純には比較できない。そこでイメージを構成する各測定点における TIC が同一となるように SIMtool を用いて補正した (TIC normalization)。ファモチジンを投与したマウスはファモチジン標準物質の検出で得られた m/z 338.05 ($[M+H]^+$), m/z 360.05 ($[M+Na]^+$), m/z 376.00 ($[M+K]^+$) の中で最も強度の高かった $[M+H]^+$ m/z 338.05 に着目し、その全身分布を Fig. 1E に示した。各測定点におけるイオン強度の違いを色で示している。ファモチジンを投与したマウスでは腎臓に一致する領域に

相対的に高い強度が得られ、肝臓、心臓、肺、消化管にも分布が見られたが、他の臓器からは分布は認められなかった。Fig. 1C に腎臓領域の MS スペクトルを示した。Fig. 1B の標準物質の MS スペクトルと同様、 m/z 338.05 ($[M+H]^+$), m/z 360.05 ($[M+Na]^+$), m/z 376.00 ($[M+K]^+$) にファモチジン由来と考えられるピークを確認した。比較対象としてコントロールマウス全身切片上の m/z 338.05 の分布を Fig. 1F に示した。コントロールマウス全身切片では m/z 338.05 の分布は全く認められなかったことから、投与したファモチジンが主に腎臓に分布していることが示唆された。この結果は過去に報告されているファモチジン筋肉内投与 5 分後に主に腎臓、次いで肝臓に未変化体で存在するという全身オートラジオグラフィーの結果と同様であった²⁵⁾。さらに Fig. 1E の腎臓を示す領域では中心部に強い強度を示したことから、腎臓の組織内でも分布の違いが生じていると考えられた。

3.3 MS/MS 測定による解析

質量顕微鏡による薬物解析では、投与した薬物がイオン化した場合、組織中の生体成分と同じピークを示す可能性がある。そこであらかじめ標準物質の MS/MS 測定を行い、断片化ピークと MS 測定で得られたピークを比較して目的の物質であることを確認する必要がある。

ITO スライドガラス上でファモチジン標準物質の m/z 338.05 をプリカーサーイオンとして断片化させ、MS/MS 測定を行った結果を Fig. 2A に示す。 m/z 259.08 に最も強いピークが、次いで m/z 189.02 にピークが現れ、合計二つのピークが認められた。これらはファモチジンが構造式の矢印で示した部分でそれぞれ断片化し、プロトン付加体として検出されたものと考えられる。また、コントロール組織切片上へファモチジン標準物質とマトリックス溶液を滴下して MS/MS 測定した結果を Fig. 2B に示す。Fig. 2A と同様に m/z 259.08, m/z 189.02 にピークを確認できた。これらの結果から、 m/z 259.08, m/z 189.02 はファモチジン由来のピークであることが示唆された。

3.4 MS/MS イメージング

Fig. 2C に MS/MS イメージングを行ったファモチジン投与マウスの断面図を、Fig. 2D, E にプリカーサーイオンピーク m/z 338.05 の断片化により得られた m/z 259.08, m/z 189.02 のイオンイメージを示す。 m/z 259.08 では MS 測定と同様に他の臓器と比較して腎臓に高いシグナル強度が得られた。一方、 m/z 189.02 では腎臓へ分布している様子が見受けられたが、他の臓器には分布は見られなかった。これは、Fig. 2B に示すように、断片化により得られた m/z 189.02 のピーク強度が m/z 259.08 のピーク強度に比べて低いことから、イメージングに十分な強度が得られなかったために、相対的に強い強度が見込まれる腎臓のみがイメージングできたと考えられる。ここまでの結果から、マウスに投与したファモチジンは、投与 3 分後には大部分が主に腎臓に存在していることを示すことができた。

このような薬物投与後の分布情報を得ることは医薬品開

Fig. 2. MS/MS spectrum of Famotidine and the MS/MS ion image on a whole-body section. A; Structure and MS/MS spectrum of Famotidine. Red lines show fragment points. B; MS/MS spectrum of Famotidine detected in a tissue section. C; Optical image of a mouse tissue section. D, E; MS/MS ion images of a mouse tissue section at 3 min after the injection of Famotidine (m/z 338.05 $\rightarrow$ 259.08, D and m/z 338.05 $\rightarrow$ 189.02, E). Famotidine is localized to a significant extent in the kidney.

Fig. 3. High resolution ion image of Famotidine in the kidney. A; Optical image of the kidney in a whole-body section. B, C; MS (m/z 338.04, B) and MS/MS (m/z 338.05 $\rightarrow$ 259.08, C) images of Famotidine. The data indicate that Famotidine is concentrated in the renal pelvis. Arrows indicate vessels.

発では重要なことである。例えば、開発中の糖尿病治療薬のほとんどが腎臓へ集積し尿中から排泄されるとしたら、腎機能低下を起こしやすい糖尿病患者に投与するには注意が必要である。また、いくつかの合併症を起こしている場

合、他の薬物を併用するため同じ代謝経路で排泄される場合は相互作用を起こしやすくなり、副作用発現の危険性が高まる。医薬品開発における多くの問題を解決するために改良を重ねた候補薬物を、評価のたびにラジオアイソトープ化に時間を費やすよりも、IMSを用いることで迅速な評価を行うことが可能になる。

3.5 腎臓内高解像度イメージング

ファモチジンのような主に腎臓で排出される薬物は腎臓によって濃縮を受け、最終的に尿中へ排出される。マウス腎臓断面図を Fig. 3A に示した。腎臓は組織学的に外側から腎皮質、腎髄質、腎盂と呼ばれる構造からなり、全身から血液に乗って集められた薬物はこの順で血液中からろ過され、水分の再吸収による濃縮を受けながら尿路へ向かい膀胱に蓄積され排泄される。中央に位置する白色の部分は濃縮を受けた尿が集まる腎盂である。ここでは点線で示した領域を 50 μ m 間隔で MS および MS/MS イメージング測定を行った。Fig. 3B, C はそれぞれファモチジンの MS イメージング測定によるイオンイメージ (m/z 338.05) と MS/MS イメージング測定によるイオンイメージ (m/z 259.08) を示している。この実験結果から、Mass Microscope の高い解像度を用いて腎臓内の薬物分布を示すことができた。B, C いずれの場合も皮質や髄質と比べて腎盂に高い分布強度が認められた。また、血管に合致する領域では相対的に低い分布強度を示した。これは腎臓における排泄過程でファモチジンが濃縮を受けているため、周りの髄質、皮質と比較して腎盂で高い強度を示したと考えられる。

このように、高解像度で薬物の組織分布を示すことができる IMS を、治療を目的とした薬物の体内や癌などの病変部位への分布の評価に応用していけば、医薬品開発の発展に貢献できると考えている。

4. 結 論

ファモチジンを尾静脈内投与したマウスの全身分布を Mass Microscope を用いて解析した結果、腎臓、肝臓、心臓、肺、消化管への分布を観察することができた。これはこれまでに報告されているオートラジオグラフィーの結果と一致しており、Mass Microscope が薬物動態を解析するためのツールとして有用であることが示唆された。また、高解像度測定によって腎臓内のファモチジンの分布を解析し、腎盂への集積を示すことができ、Mass Microscope が薬物の体内動態の詳細な情報を得るために有用な装置であることが示された。

謝 辞 本研究に協力いただいた、浜松医科大学の池上浩司博士と堤 弘次博士、Weizmann Institute of Science の Hyun-Jeong Yang 博士に感謝する。本研究は JST プロトタイプ実証・実用化プログラムの援助を受けて行われた。

文 献

- 1) K. L. Busch, G. L. Glish, and S. A. McLuckey, "Mass

- Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry," VCH Publishers, New York (1988), p. 285.
- 2) E. J. Mancini, F. de Haas, and S. D. Fuller, *Structure*, **5**, 741 (1997).
 - 3) K. Hiraoka, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **58**, 175 (2010).
 - 4) K. Onoue, N. Zaima, Y. Sugiura, T. Isojima, S. Okayama, M. Horii, Y. Akai, S. Uemura, G. Takemura, H. Sakuraba, Y. Sakaguchi, M. Setou, and Y. Saito, *Circ. J.*, **75**, 221 (2010).
 - 5) 松尾二郎, 瀬木利夫, 青木学聡, 表面科学, **31**, 564 (2010).
 - 6) A. Benninghoven and W. K. Sichtermann, *Anal. Chem.*, **50**, 1180 (1978).
 - 7) D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, A. Brunelle, and O. Laprevote, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1608 (2005).
 - 8) M. Stoeckli, D. Staab, M. Staufienbiel, K. H. Wiederhold, and L. Signor, *Anal. Biochem.*, **311**, 33 (2002).
 - 9) S. Shimma, Y. Sugiura, T. Hayasaka, Y. Hoshikawa, T. Noda, and M. Setou, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **855**, 98 (2007).
 - 10) S. Shimma, Y. Sugiura, T. Hayasaka, N. Zaima, M. Matsumoto, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **80**, 878 (2008).
 - 11) S. Shimma and M. Setou, *J. Mass. Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 145 (2007).
 - 12) S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J. L. Herman, T. A. Gillespie, and R. M. Caprioli, *Anal. Chem.*, **78**, 6448 (2006).
 - 13) Y. Sugiura and M. Setou, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **5**, 31 (2010).
 - 14) T. Yagi and M. Okubo, *JPMA News Letter*, No. 136, 33 (2010).
 - 15) T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, K. Shrivasa, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, and M. Setou, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 1446 (2010).
 - 16) Y. Takizawa, K. Mizuta, T. Hayasaka, H. Nakanishi, J. Okamura, H. Mineta, and M. Setou, *Audiol. Neurotol.*, **16**, 315 (2010).
 - 17) H. Echizen and T. Ishizaki, *Clin. Pharmacokinet.*, **21**, 178 (1991).
 - 18) L. P. James, T. Marotti, C. D. Stowe, H. C. Farrar, B. J. Taylor, and G. L. Kearns, *J. Clin. Pharmacol.*, **38**, 1089 (1998).
 - 19) T. Kawamoto, *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 1805 (1990).
 - 20) T. Harada, A. Yuba-Kubo, Y. Sugiura, N. Zaima, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, M. Wakui, M. Suematsu, K. Take-shita, K. Ogawa, Y. Yoshida, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **81**, 9153 (2009).
 - 21) Y. Sugiura, S. Shimma, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **78**, 8227 (2006).
 - 22) R. Lemaire, M. Wisztorski, A. Desmons, J. C. Tabet, R. Day, M. Salzet, and I. Fournier, *Anal. Chem.*, **78**, 7145 (2006).
 - 23) T. J. Garrett, M. C. Prieto-Conaway, V. Kovtoun, H. Bui, N. Izgarian, G. Stafford, and R. A. Yost, *Int. J. Mass Spectrom.*, **260**, 166 (2007).
 - 24) M. Setou, T. Hayasaka, S. Shimma, Y. Sugiura, and M. Matsumoto, *Appl. Surf. Sci.*, **255**, 1555 (2008).
 - 25) Y. Esumi, T. Ueda, Y. Jin, S. Tsutsumi, S. Takiie, T. Yokoshima, H. Imasaki, and H. Matsui, *The Clinical Report®*, **21**, 111 (1987).

Keywords: IMS, Mass microscope, High spatial-resolution